

DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46  
УДК 616.34-006.6-033.2:575.113

Для цитирования: *Кутилин Д.С., Кит О.И.* Зависимость выживаемости и метастазирования у больных колоректальным раком от транскрипционной активности РТ-генов. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(1): 37–46. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46

For citation: *Kutilin D.S., Kit O.I.* Relationship between the transcriptional activity of CT-genes and survival in colorectal cancer patients. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(1): 37–46. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46

## ЗАВИСИМОСТЬ ВЫЖИВАЕМОСТИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ОТ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ РТ-ГЕНОВ

Д.С. Кутилин, О.И. Кит

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, г. Ростов-на-Дону, Россия  
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63. E-mail: k.denees@yandex.ru

### Аннотация

**Введение.** Высокие показатели заболеваемости колоректальным раком и летальности от этого заболевания свидетельствуют об острой необходимости применения новых высокоспецифичных диагностических и прогностических молекулярных маркеров. В этом аспекте особый интерес представляют раково-тестикулярные антигены. **Целью исследования** явился анализ транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком с наличием метастазов (T1–4N1–2M1–2) и без них (T1–3N0M0) и её связи с отдаленной выживаемостью. **Материал и методы.** Величины относительной экспрессии 16 генов (*MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B1*, *MAGE-B2*, *GAGE-1*, *GAGE-3*, *GAGE-4*, *MAGE-C1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SCP1*, *PRAME1*) определяли методом ПЦР в режиме реального времени. **Результаты.** Обнаружены статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии *SSX2* и *PRAME1* в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной ткани и снижение экспрессии *BAGE* в опухолевой ткани относительно нормальной ткани у больных колоректальным раком без метастазов. У пациентов с наличием метастазов обнаружены статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии генов *GAGE1*, *SCP1* и *PRAME1*, а также снижение экспрессии генов *MAGEA2*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE4* и *NY-ESO1* в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной ткани. Установлено, что на общую выживаемость пациентов и отдаленное метастазирование статистически значимое ( $p < 0,05$ ) влияние оказывает экспрессия генов *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* и *MAGEB1*. **Выводы.** Полученные данные являются основой для формирования панели эффективных иммунотерапевтических мишеней и прогностических маркеров для колоректального рака дифференциально для двух групп пациентов – с метастазами и без них.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, раково-тестикулярные антигены, экспрессия, метастазы, выживаемость.

## RELATIONSHIP BETWEEN THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF CT-GENES AND SURVIVAL IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

D.S. Kutilin, O.I. Kit

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia  
63, 14<sup>th</sup> Line Street, Rostov-on-Don, 344037, Russia. E-mail: k.denees@yandex.ru

## Abstract

**Introduction.** High incidence and mortality rates of colorectal cancer indicate an urgent need for the use of new highly specific diagnostic and prognostic molecular markers. In this aspect, cancer testis antigens (CTAs) are of particular interest. **The aim of the study** was to analyze the relationship between the transcriptional activity of CTAs and survival in colorectal cancer patients with metastases (T1–4N1–2M1–2) and without metastases (T1–3N0M0). **Results.** The relative expression of 16 genetic loci (*MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B1*, *MAGE-B2*, *GAGE-1*, *GAGE-3*, *GAGE-4*, *MAGE-C1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SCP1* and *PRAME1*) was determined by real-time PCR. In colorectal cancer patients having no metastases, the expression of *SSX2* and *PRAME1* genes was significantly higher and the expression of *BAGE* was significantly lower in colon tumor tissue than in normal tissue ( $p < 0.05$ ). In colorectal cancer patient with metastases, the expression of *GAGE1*, *SCP1* and *PRAME1* genes was significantly higher and the expression of *MAGEA2*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE4* and *NY-ESO1* genes was significantly lower in colon tumor tissue than in normal tissue ( $p < 0.05$ ). The expression of the *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* and *MAGEB1* genes was found to have a significant impact on the overall survival and the development of distant metastasis ( $p < 0.05$ ). **Conclusion.** The data obtained are the basis for the formation of a panel of effective immunotherapeutic targets and prognostic markers for colorectal cancer patients with and without metastases.

**Key words:** colorectal cancer, cancer-testis antigens, expression, metastases, survival.

## Введение

Колоректальный рак (КРР) – группа злокачественных новообразований, которая занимает 4-е место среди всех онкологических заболеваний по числу летальных случаев. Ежегодно во всем мире фиксируют около 1 000 000 новых случаев КРР и более 700 000 смертей от этого заболевания. В Российской Федерации за последние 10 лет значительно увеличилась заболеваемость КРР. В настоящее время уровень летальности в течение 1-го года достигает 40 %, частота метастазов превышает 50 %, а пятилетняя выживаемость без специального лечения составляет не более 2 % [1]. Эти показатели свидетельствуют о необходимости применения новых высокоспецифичных диагностических и прогностических молекулярно-генетических маркеров КРР. Из известных опухолевых антигенов особое внимание в этом плане привлекают раково-тестикулярные антигены (РТА, Cancer Testis Antigens (CTA)) [2–4].

При КРР транскрипционная активность генов раково-тестикулярных антигенов (РТ-генов) охарактеризована недостаточно полно [2, 5]. Первые исследования РТ-генов при КРР, проведенные в конце прошлого века, показали гиперэкспрессию *MAGEA-1*, *MAGEA-2* и *MAGEA-3* не более чем в 30 % случаев (в выборку были включены 54 больных), при этом экспрессия РТ-генов чаще была повышена у больных КРР с метастазами [2, 3]. Существует предположение, что агрессивные формы опухолей толстой кишки гиперэкспрессируют гены семейства *MAGE*, и это может способствовать метастазированию. Однако степень со-экспрессии данных генов или экспрессии, по крайней мере, одного РТ-гена из семейства *MAGE* практически не исследована в первичных опухолях толстой кишки (анализ транскрипционной активности проводился в основном в метастазах в печень), что накладывает

определенные ограничения на выводы, сделанные на основании этих данных [2, 6].

**Целью исследования** явились анализ транскрипционной активности РТ-генов у больных КРР с наличием (T1–3N1–2M1–2) и без регионарных и отдаленных метастазов (T1–3N0M0) и её связи с отдаленной выживаемостью.

## Материал и методы

В исследование были включены 30 больных с первичным раком толстой кишки (группа 1) и 30 больных с метастатическим раком толстой кишки (группа 2), проходивших лечение в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте в 2016–19 гг. Все пациенты, участвующие в исследовании, подписали информированное согласие. Выборку гистологически подтвержденных КРР-опухолей составили аденокарциномы (G2–G3).

Фрагменты тканей (опухолевой и условно нормальной) толстой кишки, полученные в ходе оперативного вмешательства, гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем 4М гуанидин тиоцианат, цитрат натрия, саркозил и меркаптоэтанол. Выделение суммарной РНК из лизата тканей проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Для очистки от примесей геномной ДНК образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы-1. Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США). Для оценки качества полученного препарата РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (интенсивность полос 18S и 28S в соотношении 1:1 свидетельствовала о приемлемом для дальнейшей работы качестве РНК) (рис. 1) [7].

Синтез кДНК проводили с использованием наборов «Reverta-L» («Интерлабсервис», Россия). Методом ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR)

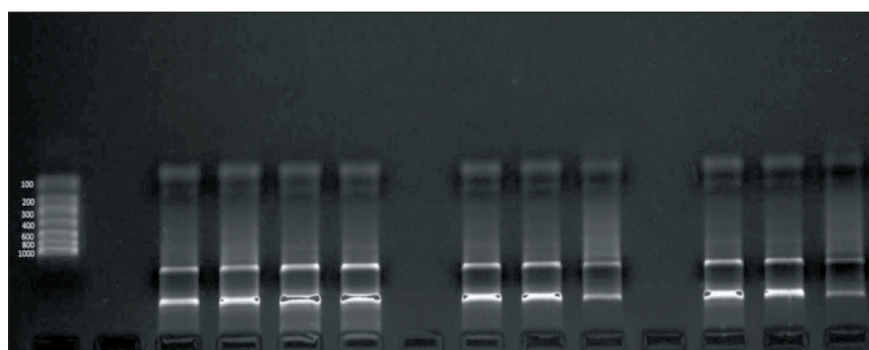


Рис. 1. Электрофореграмма РНК, выделенной из тканей опухолей толстой кишки (визуализация на GelDoc XR PLUS)  
Fig. 1. Electropherogram of RNA isolated from colon tumor tissues (visualized on GelDoc XR PLUS)

определяли величины относительной экспрессии 16 генетических локусов: *MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B1*, *MAGE-B2*, *GAGE-1*, *GAGE-3*, *GAGE-4*, *MAGE-C1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SCP1* и *PRAME1*. Выбор референсного локуса осуществляли с использованием алгоритма, описанного в работе Д.И. Водолажского и др. [8]. При выполнении алгоритма вычисляются значения *M Value* и *Stability* ( $\ln(1/M)$ ). Гены со значениями *M* менее 0,50 считаются «идеальными». В качестве референсных были выбраны два генетических локуса *GAPDH* ( $M=0,06$ ,  $Stability=2,70$ ) и *GUSB* ( $M=0,18$ ,  $Stability=1,70$ ).

В исследовании использовали синтетические олигонуклеотиды (праймеры) (табл. 1), разработанные Д.И. Водолажским и соавт. [9]. RT-PCR-амплификацию (в трех технических повторах для каждого образца) проводили на термоциклере CFX96 («Bio-Rad», США) в 25 мкл реакционной смеси (содержащей 12 нг кДНК, 0,25мМ каждого

из dNTP, 2,5 мМ  $MgCl_2$ , 1х-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсных генов или гена-мишени) по следующей программе:  $t=95^{\circ}C$  3 мин, 40 циклов:  $t=95^{\circ}C$  10 сек,  $t=58^{\circ}C$  (отжиг праймеров,  $T_a$  подбиралась экспериментальным путем с использованием температурного градиента) 30 сек (+регистрация сигнала),  $t=72^{\circ}C$  30 сек. Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле  $RE=2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Нормализацию результатов проводили по двум референсным генам *GAPDH*, *GUSB* и уровню экспрессии соответствующих генов мишеней в образцах нормальной ткани, последовательно по схеме, приведенной ниже [10]:

1. Нормализация по среднему референсных генов:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{g\_reference}},$$

Таблица 1/Table 1

### Панель праймеров [9]

#### Primer panel [9]

Название гена/ Gene name	Последовательности праймеров/Primer sequences	
	Прямой праймер/Direct primer	Обратный праймер/Reverse primer
<i>MAGEA1</i>	GAA GGA ACC TGA TCC AGG C	AGG GAA TTC TGT CCT CTG GG
<i>MAGEA2</i>	CGA AGG CTC CGT GAG GA	CTG TAT TGA CCT GAG TCA CC
<i>MAGEA3</i>	TGA GCA AAG AGC GAC GG	TCA GAC TGT CCC CTC AGA A
<i>MAGEB1</i>	TTC AGT GTG GTG TCC AGC AA	CGA GTT GTA CTC CTG GAT GAT CA
<i>MAGEB2</i>	AGC CAG GGG TGA ATT CTC TG	GGC ACG GAG CTT ACT CTC CT
<i>GAGE1</i>	CTG ATG GGC ACG AGA TGG AC	CCA GTC TCG GCA ACA TAG TGA
<i>GAGE3</i>	TCA CAC AGC TGA GTT GGC GA	CTG TGT GAA ATA TGA GTT GGC GC
<i>GAGE4</i>	GAG GAG GTG AAA ACG CCT GG	GCA TCA TTT CAA CGT GCC TTC G
<i>MAGEC1</i>	ACG AGG ATC GTC TCA GGT CC	CCA GGT CTT CAA CTC CTG CC
<i>MAGEA4</i>	CTG ACC AGC AGC TTG GGA TC	TCC AGG GAA TCC TGT CCT CCT
<i>BAGE</i>	GCC GGC TCC TTT CAG GAT TT	ACA TCT TTC AGG AGC TTG GTC AC
<i>XAGE3</i>	ACT TGC CCT GAG ACT TAG TT	ACT TGC CCT GAG ACT TAG TTT
<i>NY-ESO1</i>	GAG TTC ACT GTG TCC GGC AC	TGG AGA CAG GAG CTG ATG GA
<i>SSX2</i>	TAC GGT TGG TGC TCA AAT ACC	CCG AGG CTT TCA TCT TTT CCT
<i>SCP1</i>	AGG TGA AAC CTC AGA CCC T	AGT CTT TGC AAA TGG AAA CTC AAT
<i>PRAME1</i>	GCT GAG CCA TTG TCT CGT TAC T	AGG CTC AGT CAC TTG TTG CC
<i>GAPDH</i>	GTC AAG GCT GAG AAC GGG AA	TCG CCC CAC TTG ATT TTG GA
<i>GUSB</i>	CAG GAC CTG CGC ACA AGA C	CTA GCG TGT CGA CCC CAT TG

где  $C(t)_{g\_reference}$  – среднее геометрическое  $C(t)$  референсных генов.

2. Расчёт  $2^{-\Delta C(t)}$  по каждому гену для контрольной (условно-нормальная ткань) и опытной (опухолевая ткань) групп.

3. Расчёт медианы для матрицы данных  $2^{-\Delta C(t)}$  по каждому гену для контрольной и опытной групп.

4. Нормализация по контрольной группе (окончательный результат – кратное различие):

$$2^{-\Delta\Delta C(t)} = \frac{2^{-\Delta C(t)_{\text{медиана опытной группы}}}}{2^{-\Delta C(t)_{\text{медиана контрольной группы}}}} = \frac{2^{-\Delta C(t)_{\text{медиана опытной группы}}}}{2^{-\Delta C(t)_{\text{медиана контрольной группы}}}} = 2^{-(\Delta C(t)_{\text{медиана опытной группы}} - \Delta C(t)_{\text{медиана контрольной группы}})}$$

Статистический анализ выполняли с использованием STATISTICA 8.0 и IBM SPSS Statistics v.23.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости  $p < 0,05$ . Оценку выживаемости в клинических группах проводили с помощью метода Каплана–Мейера. Сравнение кривых выживаемости в различных группах пациентов, построенных по методу Каплана–Мейера, проводилось с использованием логарифмического рангового критерия (Log-rank test). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  (95 % точности). Для изучения связи экспрессии РТ-генов с наблюдаемыми временами жизни больных КРР использовали модель пропорциональных интенсивностей Кокса. Силу влияния на выживаемость характеризовали  $\beta$ -стандартизованный коэффициент регрессии по величине и его статистическая значимость. Для проверки ограничений на параметры статистических моделей, оценённых на основе выборочных данных, использовали статистику (тест) Вальда. Оценку взаимосвязи сопряжения между признаками (летальный исход и экспрессия генов, метастазирование и экспрессия генов) осуществляли с помощью лог-линейного метода и метода построения таблиц сопряженности. Коэффициент сопряженности Пирсона  $\chi^2$  с поправкой на правдоподобие Мантеля–Хэнзеля позволял оценить силу взаимосвязи между признаками.

## Результаты

В исследовании, проведенном на объединенной выборке, включающей 60 пациентов с наличием (T1–4N1–2M1–2) и без (T1–3N0M0) регионарных и отдаленных метастазов, обнаружено значимое ( $p < 0,05$ ) изменение транскрипционной активности РТ-генов: увеличение в 3,8 и 8,5 раза для *SSX2* и *PRAME1* соответственно и снижение для *BAGE* в 1,9 раза в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 2). Экспрессия генов *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *MAGEA4*, *XAGE3*, *NY-*

*ESO1* и *SCP1* в ткани опухоли значимо ( $p > 0,05$ ) не отличается от уровня экспрессии в нормальной ткани толстой кишки.

У больных КРР без метастазов обнаружено значимое ( $p < 0,05$ ) изменение транскрипционной активности РТ-генов: снижение для гена *BAGE* в 1,9 раза и увеличение для генов *MAGEB1* и *SSX2* в 2,0 и 5,2 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 3). У больных КРР с метастазами выявлено значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение транскрипционной активности РТ-генов *GAGE1*, *SCP1* и *PRAME1* в 2,1; 3,1 и 9,9 раза соответственно, а также снижение транскрипционной активности генов *MAGEA2*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE4* и *NY-ESO1* в 2,8; 2,3; 2,7; 3,1 и 2,5 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 3). При этом в данной группе в опухолевой ткани экспрессия генов *GAGE1* и *SCP1* была в 3,3 и 3,6 раза соответственно выше ( $p < 0,05$ ), чем экспрессия у пациентов без метастазов. Экспрессия генов *MAGEA2*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *NY-ESO1* и *SSX2* в опухолевой ткани была значимо ниже в 2,6; 4,7; 3,8; 2,4; 3,1; 3,6 и 3,1 раза соответственно ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов без метастазов (рис. 3).

Дифференциально для пациентов 1 и 2-й групп проведена оценка выживаемости (рис. 4). В группе 1 летальный исход наблюдался у 2 (6,7 %) больных, 3-летняя выживаемость составила 93,3 % ( $n=28$ ). В группе 2 летальный исход наблюдался у 22 (73,3 %) больных, 3-летняя выживаемость составила 26,7 % ( $n=8$ ). Медиана общей выживаемости больных в группе 2 составила 35 мес. В группе 2 у всех больных в разные сроки за 36 мес возникли отдаленные метастазы. В зависимости от сроков их появления у пациентов этой группы рассчитана трехлетняя динамика безметастатической выживаемости (рис. 5), которая составила 24 мес, нижний квартиль (25 %) – 15,5 мес, верхний квартиль – 28,5 мес. Таким образом, у 50 % пациентов безметастатическая выживаемость равнялась 15,5–28,5 мес.

С использованием регрессионного анализа оценено влияние экспрессии РТ-генов в ткани опухоли на общую выживаемость больных всей выборки, объединенных в группы 1 и 2. Транскрипционная активность РТ-генов ранжирована следующим образом: 0 – снижена в опухоли относительно нормы, 1 – не изменена в опухоли относительно нормы, 2 – повышена в опухоли относительно нормы, 4 – повышена в опухоли относительно нормы более чем в 9,0 раз. Установлено, что на общую выживаемость в обеих группах значимое влияние ( $p < 0,001$ ) оказывала экспрессия генов *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2* и *SCP1* (табл. 2).  $\beta$ -стандартизованные коэффициенты регрессии, выражающие силу взаимосвязи, имели высокие значения. Статистика Вальда имела высокое значение, что с большой вероятностью позволяло отвергнуть нулевую ги-

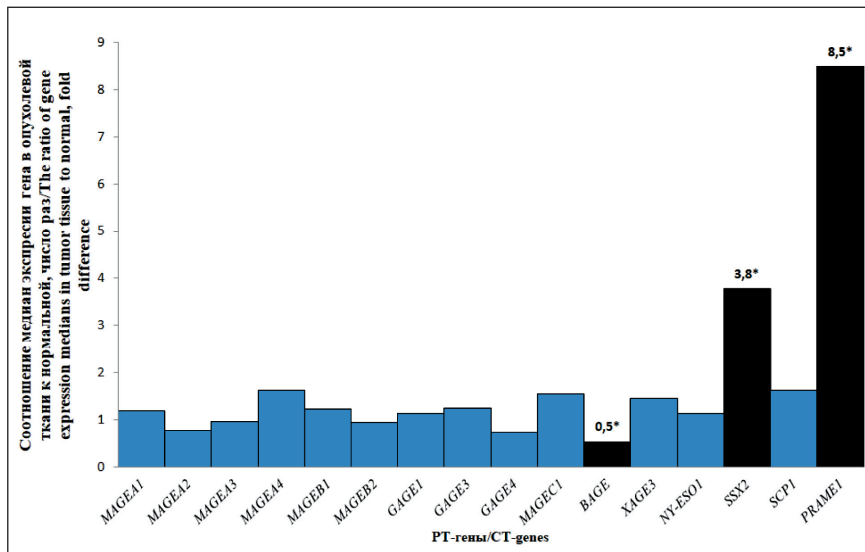


Рис. 2. Транскрипционная активность РТ-генов в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной (n=60). Примечание: \* – отличия между опухолевой и нормальной тканью толстой кишки статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Fig. 2. Transcriptional activity of CT genes in colon tumor tissue compared to normal tissue (n=60). Note: \* – statistically significant differences between tumor and normal tissues of the colon ( $p < 0.05$ )

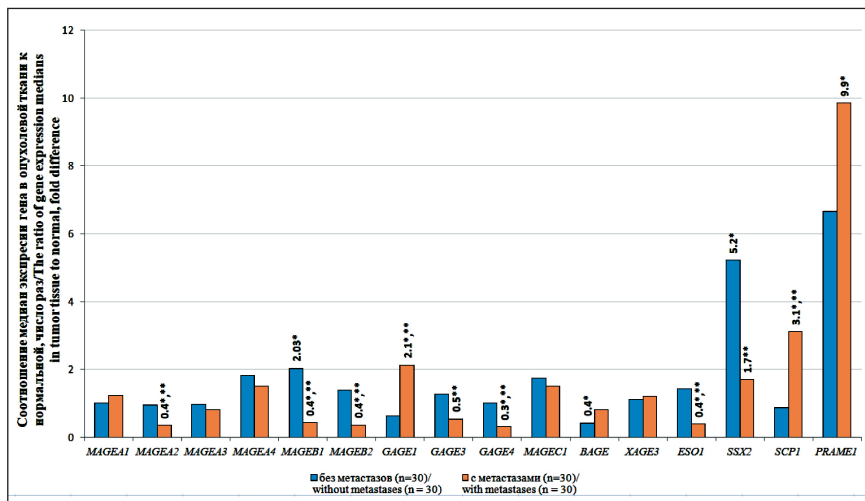


Рис. 3. Транскрипционная активность РТ-генов в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной у пациентов с метастазами (n=30) и без них (n=30). Примечание: \* – отличия между опухолевой и нормальной тканью статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\* – отличия между пациентами с метастазами и без них статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Fig. 3. Transcriptional activity of CT genes in tumor tissue compared to normal tissue in patients with metastases (n=30) and without metastases (n=30). Note: \* – statistically significant differences between tumor and normal tissues ( $p < 0.05$ ); \*\* – statistically significant differences between patients with and without metastases ( $p < 0.05$ )

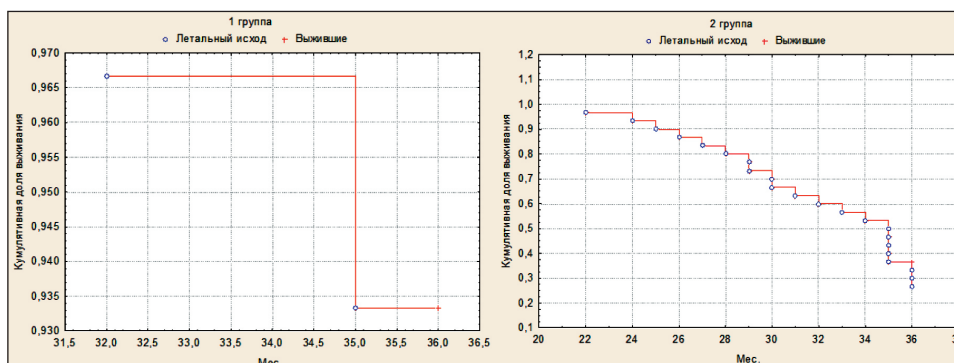


Рис. 4. Кривая Каплана–Мейера общей выживаемости больных 1 и 2-й группы

Fig. 4. Kaplan–Meier curve of overall survival of patients in groups 1 and 2

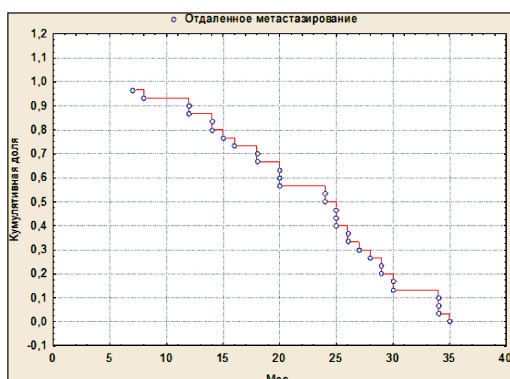


Рис. 5. Кривая Каплана–Мейера безметастатической выживаемости больных 2-й группы

Fig. 5. Kaplan–Meier curve of metastasis-free survival in group 2 patients

Таблица 2/Table 2

Результаты регрессионной модели Кокса пропорциональных рисков по сопряжению экспрессии генов в опухолевой ткани и общей выживаемости больных КРР

Results of the Cox regression model of proportional risks for the coupling of gene expression in tumor tissue and overall survival of patients with colorectal cancer

Экспрессия генов/ Gene expression	β-стандартизированный коэффициент регрессии/ β-standardized regression coefficient	Wald	p	χ <sup>2</sup> , (p)
<i>GAGE1</i>	2,86 ± 0,74	14,89	<0,001	29,47 (p<0,0001)
<i>BAGE</i>	2,86 ± 0,74	14,89	<0,001	29,47 (p<0,0001)
<i>SSX2</i>	-2,23 ± 0,59	14,43	<0,001	46,10 (p<0,0001)
<i>MAGEA2</i>	-3,15 ± 0,74	18,05	<0,0001	36,96 (p<0,0001)
<i>SCP1</i>	1,58 ± 0,37	18,05	<0,0001	12,55 (p<0,0001)

Таблица 3/Table 3

Распределение пациентов с КРР в зависимости от летального исхода и ранга экспрессии генов в опухолевой ткани

Distribution of patients with colorectal cancer depending on the lethal outcome and the rank of gene expression in tumor tissue

Ген/Gene	Группа/ Group	Летальный исход/Lethal outcome Ранг экспрессии/Rank of gene expression			
		0	1	2	4
<i>MAGEB1</i>	M0	—	8 (22,22 %)	28 (77,78 %)	—
	M1	24 (100,0 %)	—	—	—
<i>GAGE1</i>	M0	—	28 (77,78 %)	8 (22,22 %)	—
	M1	—	2 (8,33 %)	22 (91,67 %)	—
<i>NY-ESO1</i>	M0	3 (8,33 %)	33 (91,67 %)	—	—
	M1	24 (100,0 %)	—	—	—
<i>BAGE</i>	M0	28 (77,78 %)	8 (22,22 %)	—	—
	M1	2 (8,33 %)	22 (91,67 %)	—	—
<i>SSX2</i>	M0	3 (8,33 %)	5 (13,89 %)	28 (77,78 %)	—
	M1	23 (95,83 %)	—	1 (4,17 %)	—
<i>MAGEA2</i>	M0	5 (13,89 %)	31 (86,11 %)	—	—
	M1	22 (91,67 %)	2 (8,33 %)	—	—
<i>SCP1</i>	M0	—	—	31 (86,11 %)	5 (13,89 %)
	M1	—	—	2 (8,33 %)	22 (91,67 %)

Таблица 4/Table 4

Сопряжения между экспрессией генов и общей выживаемостью в течение 36 мес после операции  
Coupling characteristics between gene expression and overall survival 36 months after surgery

Ген/Gene	Критерий/Criterion	Величина критерия/Criterion value	p
<i>MAGEB1</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	80,76	<0,0001
<i>GAGE1</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	31,27	<0,0001
<i>NY-ESO1</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	61,92	<0,0001
<i>BAGE</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	31,27	<0,0001
<i>SSX2</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	53,47	<0,0001
<i>MAGEA2</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	39,80	<0,0001
<i>SCP1</i>	Критерий Пирсона χ <sup>2</sup> с MX/ Pearson's criterion χ <sup>2</sup> with MH	39,80	<0,0001

Примечание: MX – поправка Мантеля–Хэнзеля.

Note: Mantel–Haenszel test.

Таблица 5/Table 5

**Направленность изменения экспрессии генов, ассоциированная с развитием летального исхода**  
**Direction of changes in gene expression associated with the development of a lethal outcome**

Ген/Gene	Направленность изменения экспрессии генов/ Directional change in expression	p
MAGEB1	↓	<0,0001
GAGE1	↑	<0,0001
NY-ESO1	↓	<0,0001
BAGE	↑	<0,0001
SSX2	↓	<0,0001
MAGEA2	↓	<0,0001
SCP1	↑↑	<0,0001

Таблица 6/Table 6

**Результаты регрессионной модели Кокса пропорциональных рисков по сопряжению экспрессии генов в опухолевой ткани и метастазирования**

**Results of the Cox regression model of proportional risks for the coupling of gene expression in tumor tissue and metastasis**

Экспрессия генов/ Gene expression	β-стандартизированный коэффициент регрессии/ β-standardized regression coefficient	Wald	p	χ <sup>2</sup> , (p)
<i>MAGEB1</i>	-1,74 ± 0,57	9,31	<b>0,0023*</b>	12,55 (p=0,0020)
<i>NY-ESO1</i>	-0,76 ± 0,50	2,26	0,1323	2,61 (p=0,1300)
<i>SSX2</i>	-0,76 ± 0,48	2,53	0,1118	3,11 (p=0,0780)
<i>MAGEA2</i>	-0,85 ± 0,61	1,93	0,1651	2,40 (p=0,1651)
<i>SCP1</i>	0,26 ± 0,03	0,92	0,3373	1,04 (p=0,3083)

Таблица 7/Table 7

**Распределение пациентов 1 и 2-й групп в зависимости от рангов экспрессии генов в опухолевой ткани и отдаленного метастазирования**

**Distribution of patients in groups 1 and 2 depending on the ranks of gene expression in tumor tissue and distant metastasis**

Ген/Gene	Группа/Group	Ранг экспрессии/ Expression rank			
		0	1	2	4
<i>MAGEB1</i>	M0	2 (6,67 %)	–	28 (93,33 %)	–
	M1	22 (73,33 %)	8 (26,67 %)	–	–
<i>GAGE1</i>	M0	–	30 (100,0 %)	–	–
	M1	–	–	30 (100,0 %)	–
<i>NY-ESO1</i>	M0	2 (6,67 %)	28 (93,33 %)	–	–
	M1	25 (83,33 %)	5 (16,67 %)	–	–
<i>BAGE</i>	M0	30 (100,0 %)	–	–	–
	M1	–	30 (100,0 %)	–	–
<i>SSX2</i>	M0	1 (3,33 %)	1 (3,33 %)	28 (93,33 %)	–
	M1	25 (83,33 %)	4 (13,33 %)	1 (3,33 %)	–
<i>MAGEA2</i>	M0	1 (3,33 %)	29 (96,67 %)	1 (3,33 %)	–
	M1	26 (86,67 %)	4 (13,33 %)	26 (86,67 %)	–
<i>SCP1</i>	M0	–	–	29 (96,67 %)	1 (3,33 %)
	M1	–	–	4 (13,33 %)	26 (86,67 %)

Таблица 8/Table 8

**Характеристики сопряжения между экспрессией генов и метастазированием  
в течение 36 мес после операции**

**Coupling characteristics between gene expression and metastasis 36 months after surgery**

Ген/Gene	Критерий/Criterion	Величина критерия/ Criterion value	p
<i>MAGEB1</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	69,41	<0,0001
<i>GAGE1</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	83,18	<0,0001
<i>NY-ESO1</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	40,85	<0,0001
<i>BAGE</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	83,18	<0,0001
<i>SSX2</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	60,99	<0,0001
<i>MAGEA2</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	50,25	<0,0001
<i>SCP1</i>	Критерий Пирсона $\chi^2$ с MX/ Pearson's criterion $\chi^2$ with MH	50,25	<0,0001

Примечание: MX – поправка Мантеля–Хэнзеля.

Note: Mantel–Haenszel test.

Таблица 9/Table 9

**Направленность изменения экспрессии генов, ассоциированная с развитием отдаленного  
метастазирования, по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов**

**Direction of changes in gene expression associated with the development of distant metastasis, compared  
with patients without distant metastases**

Ген/Gene	Направленность изменения экспрессии/ Directional change in expression	p
<i>MAGEB1</i>	↓	<0,0001
<i>GAGE1</i>	↑	<0,0001
<i>NY-ESO1</i>	↓	<0,0001
<i>BAGE</i>	↑	<0,0001
<i>SSX2</i>	↓	<0,0001
<i>MAGEA2</i>	↓	<0,0001
<i>SCP1</i>	↑↑	<0,0001

потезу о равенстве стандартизированного коэффициента нулю и считать полученную информацию о влиянии фактора адекватной.

В табл. 3 представлены данные по распределению пациентов с КРР в зависимости от летального исхода и ранга экспрессии изучаемых генов в опухолевой ткани. Сопряжение между экспрессией генов *MAGEB1*, *GAGE1*, *NY-ESO1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* и общей выживаемостью в течение 36 мес после операции было статистически значимым (табл. 4). Анализ таблиц кросстабуляции выявил различную направленность изменения экспрессии генов, ассоциированных с развитием летального исхода, по сравнению с пациентами без прогрессирования (табл. 5).

Корреляция между транскрипционной активностью РТ-генов в опухолевой ткани и метастазированием у больных КРР была установ-

лена только для гена *MAGEB1*. Отрицательный  $\beta$ -стандартизированный коэффициент регрессии между экспрессией *MAGEB1* и метастазированием свидетельствовал о высоком влиянии снижения экспрессии этого гена (по сравнению с больными КРР без метастазов).

Распределение пациентов групп 1 и 2 в зависимости от рангов экспрессии генов в опухолевой ткани и отдаленного метастазирования представлено в табл. 6. Распределение частот в таблицах сопряженности подвергали логлинейному анализу (табл. 7–8). При этом установлено, что от экспрессии изучаемых генов зависела также и реализация отдаленного метастазирования ( $p < 0,0001$ ). Логлинейный анализ более адекватно отражал сопряжение экспрессии генов в опухолевой ткани с отдаленным метастазированием по сравнению с регрессионным анализом. Направленность измене-

ния экспрессии изучаемых генов, ассоциированная с развитием отдаленных метастазов, отражена в табл. 9.

Таким образом, у больных КРП установлены закономерности, связывающие транскрипционную активность РТ-генов с выживаемостью и метастазированием.

### Обсуждение

У больных метастатическим и неметастатическим КРП профили экспрессии РТ-генов значительно отличаются. В обеих группах наблюдается дифференциальная экспрессия ряда РТ-генов, относящихся к разным классам: СТ-Х (*MAGEB1*, *SSX2* и др.) и non-Х (*SCP1* и др.), тестикулярно-селективным (*SSX2*, *GAGE1*, *SCP1*) и тестикулярно-ограниченным (*MAGEB1/2*). Изменение экспрессии генов *SSX2*, *GAGE1*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4* и *NY-ESO1* согласуется с данными, полученными J. Sammut et al. [6]. В отличие от данных Н.М. Shantha Kumara et al. [11] и М. Li et al. [12] для РТА из семейства *MAGEA* в нашем исследовании не выявлено значимого увеличения транскрипционной активности. Следует отметить, что в основном (исключение ген *BAGE*) только в опухолевой ткани толстой кишки пациентов с метастазами наблюдается значительное снижение транскрипционной активности ряда РТ-генов относительно опухолевой и нормальной ткани пациентов без метастазов. Снижение экспрессии данных генов может иметь важное значение для развития метастазирования. РТА достаточно давно используются в качестве мишеней для иммунотерапии основанной на ДКВ (дендритно-клеточных вакцинах), и хорошо известно, что увеличение

их экспрессии повышает иммуногенность опухолевой ткани [13, 14]. Соответственно, снижение экспрессии РТ-генов в опухолевых клетках может улучшать их маскировочный потенциал, скрывая от иммунной системы.

Это предположение частично подтверждается результатами регрессионного анализа, согласно которым *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* и *MAGEB1* статистически значимо влияют на общую выживаемость, и результатами логлинейного анализа, согласно которым *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* и *MAGEB1* статистически значимо влияют на отдаленное метастазирование. При этом направленность изменения экспрессии РТ-генов, ассоциированная с развитием отдаленного метастазирования и летальным исходом, полностью совпадает и для генов *MAGEB1*, *NY-ESO*, *SSX2* и *MAGEA2* характеризуется снижением транскрипционной активности по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов.

### Заключение

У больных метастатическим и неметастатическим КРП обнаружена дифференциальная транскрипционная активность РТ-генов *MAGEA2*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *SSX2*, *BAGE*, *NY-ESO1* и *PRAME1*. На общую выживаемость пациентов и метастазирование значимое влияние оказывает экспрессия генов *GAGE1*, *BAGE*, *SSX2*, *MAGEA2*, *SCP1* и *MAGEB1*. Полученные данные являются основой для формирования панели эффективных иммунотерапевтических мишеней и прогностических маркеров для колоректального рака дифференциально для двух групп пациентов: с метастазами и без метастазов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Харгазев Д.А., Донцов В.А., Полуэктов С.И., Зема Т.В., Лиман Н.А., Шляхова О.В., Удаленкова И.А. Влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки. Современные проблемы науки и образования. 2019; 6: 142. [Kutulin D.S., Kosheleva N.G., Gusareva M.A., Kharagev D.A., Dontsov V.A., Poluektov S.I., Zema T.V., Liman N.A., Shlyakhova O.V., Udalenkova I.A. The effect of transcriptional activity of genes that regulate DNA repair on the effectiveness of radiation therapy of rectal tumors. Modern Problems of Science and Education. 2019; 6: 142. (in Russian)].
2. Солдатова К.И., Колесников Е.Н., Габричидзе П.Н. Особенности транскрипционной активности раково-тестикулярных антигенов у больных метастатическим и неметастатическим колоректальным раком. Современные проблемы науки и образования. 2018; 5: 108. [Soldatova K.I., Kolesnikov E.N., Gabrichidze P.N. Transcriptional activity features of cancer-testis antigens in patients with metastatic and non-metastatic colorectal cancer. Modern Problems of Science and Education. 2018; 5: 108. (in Russian)].
3. Кут О.И., Солдатова К.И., Кутилин Д.С., Водолажский Д.И. Раково-тестикулярные антигены в диагностике опухолей толстой кишки. Современные проблемы науки и образования. 2018; 2: 10. [Kit O.I., Soldatova K.I., Kutulin D.S., Vodolazhsky D.I. Cancer-testis antigens in colon tumors diagnostics. Modern Problems of Science and Education. 2018; 2: 10. (in Russian)].
4. Chi Soh J.E., Abu N., Jamal R. The potential immune-eliciting cancer testis antigens in colorectal cancer. Immunotherapy. 2018 Sep; 10(12): 1093–1104. doi: 10.2217/imt-2018-0044.
5. Гольшико П.В., Новиков Д.В., Ананьев С.В., Барышников К.А., Новиков В.В. Раково-тестикулярные гены в крови и опухоли

- больных колоректальным раком. Российский биотерапевтический журнал. 2015; 14(1): 19–24. [Golysheko P.V., Novikov D.V., Ananayev S.V., Baryshnikov K.A., Novikov V.V. A Search for cancer-testis genes expression in blood and biopsy of patients with colorectal cancer. Russian Journal of Biotherapy. 2015; 14(1): 19–24. (in Russian)].
6. Sammut J., Wakeman J.A., Stuart N., McFarlane R.J. Cancer/ Testis Antigens and Colorectal Cancer. J Genet Syndr Gene Ther. 2013; 4: 149.
7. Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кут О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. Успехи молекулярной онкологии. 2019; 6(1): 57–62. [Kutulin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. Advances in Molecular Oncology. 2019; 6(1): 57–62. (in Russian)].
8. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Солдатова К.И. Изучение стабильности экспрессии референсных генетических локусов при малигнизации тканей толстой кишки. Сборник материалов 5-й итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ. 2018: 33–34. [Vodolazhsky D.I., Kutulin D.S., Soldatova K.I. Study of the stability of expression of reference genetic loci during malignancy of colon tissues. 5 itogovaya nauchnaya sessiya molodykh uchonykh. RostGMU. 2018: 33–34. (in Russian)].
9. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Мозушкова Х.А., Кут О.И. Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы. Медицинская иммунология. 2018; 20(3): 38390. [Vodolazhskiy D.I., Kutulin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. Medical Immunology. 2018; 20(3): 383–90. (in Russian)].
10. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И., Францианц Е.М., Кут О.И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных

с почечно-клеточным раком. Нефрология. 2017; 21(1): 80–6. [Kutlin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I., Frantsiyants H.M., Kit O.I. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. Nephrology. 2017; 21(1): 80–6. (in Russian)].

11. Shantha Kumara H.M., Grieco M.J., Caballero O.L., Su T., Ahmed A., Ritter E., Gnjatic S., Cekic V., Old L.J., Simpson A.J., Cordon-Cardo C., Whelan R.L. MAGE-A3 is highly expressed in a subset of colorectal cancer patients. Cancer Immun. 2012; 12: 16.

12. Li M., Yuan Y.H., Han Y., Liu Y.X., Yan L., Wang Y., Gu J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue

and adjacent normal tissue. Clin Cancer Res. 2005 Mar 1; 11(5): 1809–14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1365.

13. Wei X., Chen F., Xin K., Wang Q., Yu L., Liu B., Liu Q. Cancer-Testis Antigen Peptide Vaccine for Cancer Immunotherapy: Progress and Prospects. Transl Oncol. 2019 May; 12(5): 733–8. doi: 10.1016/j.tranon.2019.02.008.

14. Salmaninejad A., Zamani M.R., Pourvahedi M., Golchegre Z., Hosseini Bereshneh A., Rezaei N. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. Immunol Invest. 2016 Oct; 45(7): 619–40. doi: 10.1080/08820139.2016.1197241.

Поступила/Received 06.02.2020  
Принята в печать/Accepted 20.05.2020

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Кутилин Денис Сергеевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8382-4460. ORCID 0000-0002-8942-3733.

**Кит Олег Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 1728-0329. Researcher ID (WOS): U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

**Кутилин Денис Сергеевич**: разработка концепции научной работы, обработка биологического материала и проведение молекулярного анализа, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

**Кит Олег Иванович**: разработка концепции научной работы, внесение ценного интеллектуального содержания в основную концепцию, получение биологического материала и данных о выживаемости пациентов, анализ черновика рукописи и его корректировка.

#### Финансирование

*Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.*

#### Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### Благодарности

*Авторы выражают благодарность К.И. Солдатовой (аспирант РостГМУ) за помощь в сборе информации о выживаемости пациентов.*

#### ABOUT THE AUTHORS

**Denis S. Kutlin**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). SPIN-code: 8382-4460. ORCID 0000-0002-8942-3733.

**Oleg I. Kit**, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director of Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). SPIN-code: 1728-0329. Researcher ID (WOS): U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

**Denis S. Kutlin**: study conception and design, biological specimen collection and processing, statistical analysis, drafting of the manuscript.

**Oleg I. Kit**: study conception and design, data collection and interpretation, biological specimen collection, editing of the manuscript, critical revision of manuscript for important intellectual content.

#### Funding

*This study required no funding.*

#### Conflict of interests

*The authors declare that they have no conflict of interest.*

#### Acknowledgment

*The authors are grateful to K.I. Soldatova for help in collecting information on patient survival.*